

BEST AVAILABLE COPY



PATENT NO EP (UK).....**0368187**

THE BRITISH LIBRARY  
SCIENCE REFERENCE AND INFORMATION SERVICE

TRANSLATION OF EUROPEAN PATENT (UK)  
UNDER SECTION 77 (6) (a)

Date of Publication of the Translation.....**08 DEC 1993**

002

PERWENT

0171 4242516

0171 4242516

27/07.00 15:16

THE PATENT OFFICE

PATENTS ACT 1977

PATENTS FORM NO. 54/77

FILING OF TRANSLATION OF EUROPEAN  
PATENT (UK) UNDER SECTION 77(6)(a)

For official use only

Please write or type in BLOCK  
LETTERS using dark ink. For  
details of current fees please  
contact the Patent Office

Enter the name and address of the  
proprietor(s) of the European  
Patent (UK). If you do not have  
enough space please continue on a  
separate sheet

Enter the date on which the  
mention of the grant of the  
European Patent (UK) was  
published in the European Patent  
Bulletin, or, if it has not yet been  
published, the date on which it will  
be published

A UK Address for Service MUST  
be provided to which all  
communications from the Patent  
Office will be sent

Please sign here ►

Attention is drawn to rules 90 and  
106 of the Patents Rules 1982

This form must be filed in duplicate  
and must be accompanied by a  
translation into English in  
duplicate of:

- 1) the whole description
- 2) those claims appropriate to the  
UK (in the language of the  
proceedings)
- 3) all drawings, whether or not  
these contain any textual matter  
but excluding the front page which  
contains bibliographic  
information. The translation must  
be verified to the satisfaction of the  
comptroller as corresponding to  
the original text

|  |           |
|--|-----------|
| 1. European Patent<br>Number   | 0 368 187 |
| 2. Name<br>HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT<br><br>Address<br><br>D-65926 Frankfurt<br>Federal Republic of Germany   |           |
| 3. European Patent Bulletin Date:<br><br>01.09.1993<br>Day Month Year  |           |
| 4. Name of Agent (if any)<br><br>Agent's Patent Office<br>ADP number (if known)  |           |
| 5. Address for Service<br>HOECHST UK LIMITED<br>Hoechst House, Salisbury Road<br>Hounslow, Middx. Postcode TW4 6JH   |           |
| 6. Signature:<br><i>Richard</i> Date: 01 11 93<br>Day Month Year<br>pp. RWS TRANSLATIONS LTD   |           |
| Reminder<br><br>Have you attached<br><br>One duplicate copy of this form <input checked="" type="checkbox"/><br><br>Two copies of the Translation <input checked="" type="checkbox"/><br><br>Any continuation sheets (if appropriate) <input type="checkbox"/> |           |

PATENTS ACT 1977

and

PATENTS (AMENDMENT) RULES 1987

I, Alan John SPARROW, M.R.S.C.,  
translator to RWS Translations Ltd., of Europa House, Marsham  
Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England, hereby declare  
that I am conversant with the German and English languages and  
that to the best of my knowledge and belief the accompanying  
document is a true translation of the text on which the European  
Patent Office intends to grant or has granted European Patent  
No. 0,368,187  
in the name of HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

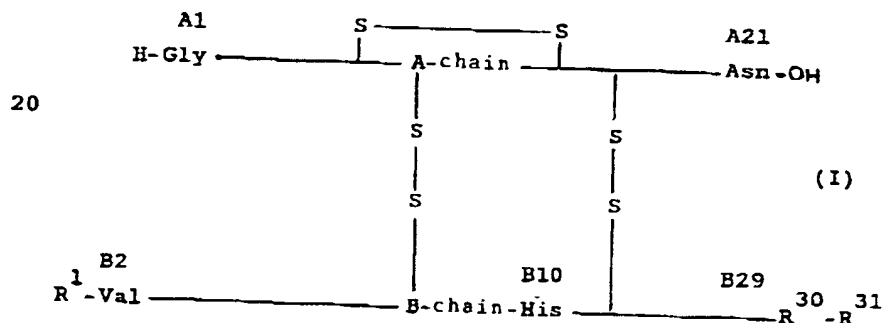
Signed this 15th day of October 1993

  
A. J. SPARROW

For and on behalf of RWS Translations Ltd.

As is known, insulin and insulin derivatives are required in considerable quantities for the treatment of the disease diabetes mellitus, and some of them are also produced on an industrial scale. Despite the considerable number of insulin compositions and modifications with different action profiles which are already in existence, there is still a need, because of the variety of organisms with their inter- and intraindividual variations, for other insulin products which in turn have other properties and action characteristics.

Insulin derivatives with a delayed action are described, for example, in EP-B 132,769 and EP-B 132,770. These are specifically derivatives with a basic modification in position B31 of the insulin B chain, of the following formula I:



25 in which  $R^1$  denotes H or H-Phe,  
 $R^{30}$  represents the residue of a neutral, genetically encodable L-amino acid, and  
 $R^{31}$  represents a physiologically acceptable organic group which is basic in nature and has up to 50 carbon atoms, in whose structure 0 to 3  $\alpha$ -amino acids are involved and whose terminal carboxyl group which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a lactone or reduced to  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

0171 4242516

0005

HERMENT

0171 4242516

27/07 00 15:17

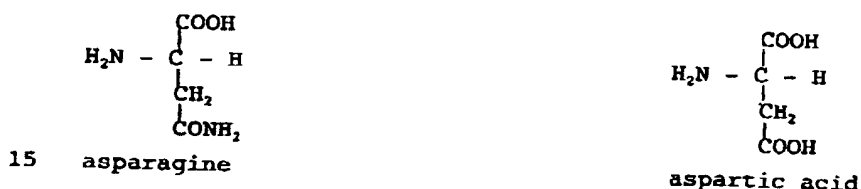
Characteristic of these insulin derivatives is an isoelectric point between 5.8 and 8.5 (measured by isoelectric focusing). The fact that the isoelectric point is shifted from the isoelectric point of unmodified natural insulin or proinsulin (at pH = 5.4) into the neutral range derives from the additional positive charge(s) located on the surface of the molecule as a result of the basic modification. This makes these insulin derivatives with a basic modification less soluble in the neutral range than, say, natural insulin or proinsulin, which are normally dissolved in the neutral range.

The delaying or depot action of the insulin derivatives with a basic modification, of the formula I, derives from their sparing solubility at the isoelectric point. According to the two abovementioned publications, the redissolution of the insulin derivatives under physiological conditions is achieved by elimination of the additional basic groups, which is brought about, depending on the derivative, by trypsin or trypsin-like and/or carboxypeptidase B or carboxypeptidase B-like and/or esterase activity. The eliminated groups are in each case either purely physiological metabolites or else easily metabolized physiologically acceptable substances.

The abovementioned depot principle resulting from basic modification of the insulin has also been further utilized by the provision and corresponding use of other insulin derivatives with basic modifications, mainly within the A and B chains; cf. for example EP-A 0,194,864 and EP-A 0,254,516.

In the insulin derivatives specified in EP-A 0,194,864, a basic amino acid is incorporated in the B27 position and/or a neutral amino acid is located at positions A4, A17, B13 and/or B21; in addition, the C-terminal carboxyl group of the B chain is blocked by an amide or ester residue.

The insulin derivatives specified in EP-A 0,254,516 are very similar to those specified in the abovementioned EP-A; however, in this case, with the aim of increasing the stability of the relevant pharmaceutical compositions at the weakly acid pH values, the amino acid Asn in position A21 can also be replaced by other amino acids which are more stable in acid medium, such as, for example, Asp. As is known, Asn (= asparagine) differs from Asp (= aspartic acid) by the blocking of one of the two carboxyl groups by the amide group:



Rapid-acting insulin derivatives are said to result from yet another modification of the insulin molecule in the A and B chain, in particular by replacing the amino acid His, which is responsible for the formation of a complex with zinc - and thus for a certain delaying action, in the B10 position by other appropriate amino acids; cf. EP-A 0,214,826.

All the insulin derivatives specified in the 3 last-mentioned publications are mainly modified within the A and B chains; they are prepared by genetic engineering routes.

In the attempt to increase the stability in acid medium of the insulin derivatives with a basic modification on the C-terminal end of the B chain as specified in the European Patents EP-B 0,132,769 and EP-B 0,132,770 mentioned in the introduction, and, where appropriate, also to alter the action profile thereof, it has now been found that this object is achieved in an advantageous manner by replacing Asn<sup>A21</sup> by other genetically encodable amino acids which contain no amide group and, where

0171 4242516

2007

DERIVAT

0171 4242516

27/07 00 15:18



R<sup>1</sup> in formula II is preferably H-Phe.

Genetically encodable L-amino acids containing no amide group - for R<sup>2</sup> - are

Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Glu, Cys, Met,  
 5 Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro;  
 Gly, Ala, Ser, Thr, Asp and Glu are preferred, especially Asp.

Neutral genetically encodable L-amino acids - for R<sup>30</sup> - are  
 Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met,  
 10 Tyr, Phe and Pro; Ala, Thr and Ser are preferred.

R<sup>31</sup> is a physiologically acceptable organic group which is basic in nature and has up to 50 carbon atoms and in whose structure 0 - 30  $\alpha$ -amino acids are involved. When no  $\alpha$ -amino acids are involved in the structure of R<sup>31</sup>,  
 15 examples of suitable basic groups for this residue are the following:

amino-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy,  
 di-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-ammonio-  
 (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, [(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl-  
 20 amino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, di-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-  
 alkylamino or [tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino,  
 especially -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>, NR<sub>1</sub>, [-O-]CH<sub>2</sub>, p-N<sup>+</sup>R<sub>1</sub>, -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> or  
 -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>1</sub>, in which p is 2 to 6, and R is identical  
 or different and represents hydrogen or (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl.

25 When up to 3  $\alpha$ -amino acids are involved in the structure of R<sup>31</sup>, these are primarily neutral or basic naturally occurring L-amino acids and/or the D-amino acids corresponding thereto. Neutral naturally occurring amino acids are, in particular, Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu,  
 30 Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro and Hyp. Basic naturally occurring amino acids are, in particular, Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit and His. If only neutral  $\alpha$ -amino acids are involved, the terminal carboxyl group thereof cannot be free - in order for R<sup>31</sup> to be basic in nature; on the  
 35 contrary, the carboxyl group must in this case be

0171 4242516

0000

PERMENT

0171 4242516

27/07 00 15:18



amidated or esterified with a basic group, suitable basic groups for this being, for example, the abovementioned basic groups - in the case where no  $\alpha$ -amino acids are involved in the structure of  $R^{31}$ . Of course, these basic ester or amide groups can also block the carboxyl group of basic  $\alpha$ -amino acids. Also possible and suitable for blocking the carboxyl group of the basic  $\alpha$ -amino acids are - if the blocking is desired - neutral ester or amide groups such as, for example,  $(C_1-C_6)$ -alkoxy,  $(C_3-C_6)$ -cycloalkoxy,  $NH_2$ ,  $(C_1-C_6)$ -alkylamino or di- $(C_1-C_6)$ -alkylamino.

Of course, the terminal carboxyl group can be in the form of a lactone only if the terminal amino acid is a hydroxyamino acid.

Moreover, the terminal carboxyl group can also be reduced to  $CH_2OH$ .

$R^{31}$  is preferably composed of 1, 2 or 3 of the abovementioned basic naturally occurring amino acids;  $R^{31}$  is particularly preferably Arg-OH or Arg-Arg-OH.

Suitable genetically encodable L-amino acids - for X - are the same amino acids as for  $R^2$ , but the genetically encodable L-amino acids which contain an amide group - which are Asn and Gln - are also possible in this case; the latter - Asn and Gln - are in fact preferred in this case. If Asn or Gln is located in position B10, the amide group is at least stable in weakly acid medium (in contrast to Asn or Gln in position A21). The sequences (A1 - A20) and (B1 - B9, B11 - B29) are preferably the sequences of human, porcine or bovine insulin, especially the sequences of human insulin.

Examples of insulin derivatives of the formula II are:

Asp<sup>A21</sup>-Human insulin-Arg<sup>B31</sup>-OH  
Glu<sup>A21</sup>- "

- |    |  |   |
|----|--|---|
|    | Gly <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Ser <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Thr <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Ala <sup>A21</sup> -   | " |
| 5  | Asp <sup>A21</sup> -Human insulin-Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH                     |   |
|    | Glu <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Gly <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Ser <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Thr <sup>A21</sup> -   | " |
| 10 | Ala <sup>A21</sup> -   | " |
|    |  |   |
|    | Asp <sup>A21</sup> -Asn <sup>B10</sup> -Human insulin-Arg <sup>B31</sup> -OH                     |   |
|    | Glu <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Gly <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Ser <sup>A21</sup> -   | " |
| 15 | Thr <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Ala <sup>A21</sup> -   | " |
|    |  |   |
|    | Asp <sup>A21</sup> -Asn <sup>B10</sup> -Human insulin-Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH |   |
|    | Glu <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Gly <sup>A21</sup> -   | " |
| 20 | Ser <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Thr <sup>A21</sup> -   | " |
|    | Ala <sup>A21</sup> -   | " |

25 The insulin derivatives of the formula II are prepared mainly by a genetic manipulation by means of site-directed mutagenesis using standard methods.

30 For this purpose, a gene structure coding for the desired insulin derivative of the formula II is constructed and its expression is brought about in a host cell - preferably in a bacterium such as E. coli or a yeast, in particular *Saccharomyces cerevisiae* - and - if the gene structure codes for a fusion protein - the insulin derivative of the formula II is liberated from the fusion protein; analogous methods are described, for example,

in EP-A 0,211,299, EP-A 0,227,938, EP-A 0,229,998,  
EP-A 0,286,956 and German Patent Application  
P 38 21 159.9 dated June 23, 1988 (HOE 88/F 158).

5 After cell disruption, the fusion protein portion is  
eliminated either chemically using cyanogen halide - cf.  
EP-A 0,180,920 or enzymatically using lysostaphin - cf.  
DE-A 3,739,347.

10 The insulin precursor is then subjected to oxidative  
sulfitolysis by the method described, for example, by  
R.C. Marshall and A.S. Inglis in "Practical Protein  
Chemistry - A Handbook" (edited by A. Darbre) 1986, pages  
49 - 53, and subsequently renatured in the presence of a  
thiol with the formation of the correct disulfide  
15 bridges, for example by the method described by G.H.  
Dixon and A.C. Wardlow in Nature (1960), pages 721 - 724.

The C peptide is removed by cleavage with trypsin - for  
example by the method of Kemmler et al., J.B.C. (1971),  
pages 6786 - 6791, and the insulin derivative of the  
20 formula II is purified by known techniques such as  
chromatography - cf., for example, EP-A-0,305,760 - and  
crystallization.

25 The insulin derivatives of the formula II with  $R^2 = \text{Asp}$   
and  $X = \text{His}$  are expediently prepared by hydrolysis of the  
known insulin derivatives which have a basic modification  
and the formula I in aqueous acidic medium (because only  
the amide group of the asparagine in position A21 must be  
hydrolyzed in this case), preferably at pH values between  
about 2 and about 4, in particular of about 2.5, and at  
temperatures of about 0 to about 40°C, preferably at room  
30 temperature.

The insulin derivatives of the formula II, according to  
the invention, and/or the physiologically tolerated salts  
thereof (such as, for example, the alkali metal or  
ammonium salts) are mainly used as active substances for

0171 4242516

2102

GERMANY

0171 4242516

27/07 00 15:20

a pharmaceutical composition for the treatment of diabetes mellitus.

5 The pharmaceutical composition is preferably a solution or suspension for injection; it contains at least one insulin derivative of the formula II and/or at least one of the physiologically tolerated salts thereof in dissolved, amorphous and/or crystalline - preferably in dissolved - form.

10 The composition preferably has a pH between about 2.5 and 8.5, in particular between about 4.0 and 8.5, and contains a suitable tonicity agent, a suitable preservative and, where appropriate, a suitable buffer, as well as preferably a certain zinc ion concentration, all, of course, in sterile aqueous solution. All the ingredients  
15 of the composition apart from the active substance form the composition vehicle.

Examples of suitable tonicity agents are glycerol, glucose, mannitol, NaCl, and calcium or magnesium compounds such as  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , etc.

20 The choice of the tonicity agent and/or preservative influences the solubility of the insulin derivative or the physiologically tolerated salt thereof at the weakly acid pH values.

25 Examples of suitable preservatives are phenol, m-cresol, benzyl alcohol and/or p-hydroxybenzoic esters.

30 Examples of buffer substances which can be used, in particular for adjusting a pH between about 4.0 and 8.5, are sodium acetate, sodium citrate, sodium phosphate etc. Otherwise, also suitable for adjusting the pH are physiologically acceptable dilute acids (typically HCl) or alkalis (typically NaOH).

When the composition contains zinc a content of 1  $\mu\text{g}$  to

2 mg, in particular from 5 µg to 200 µg, of zinc/ml is preferred.

In order to vary the action profile of the composition according to the invention it is also possible to admix  
5 unmodified insulin, preferably bovine, porcine or human insulin, in particular human insulin.

Preferred concentrations of active substance are those corresponding to about 1-1500, also preferably about 5-1000, and in particular about 40-400, international  
10 units/ml.

The invention is now explained in detail by the examples which follow.

A) Preparation by genetic manipulation

Example 1

15 Construction of a plasmid for the preparation of Gly (A21)-human insulin Arg (B31-OH)

The plasmid pSW3 has been described in German Patent Application P 38 21 159.9 (HOE 88/F 158). The plasmid DNA is reacted with the restriction enzymes Pvu2 and Sall and  
20 subsequently treated with alkaline bovine phosphatase. The two resulting fragments are separated by gel electrophoresis, and the large fragment is isolated. This fragment is linked in a T4 DNA ligase reaction with the following synthetic DNA sequence:

25 5'- CTG GAA AAC TAC TGT GGT TGA TAG  
GAC CTT TTG ATG ACA CCA ACT ATC AGCT - 5'

Competent E. coli W3110 cells are transformed with the ligation mixture. The transformation mixture is plated out on NA plates which contain 20 µg of Ap (=Ampicillin)/  
30 ml and incubated at 37°C overnight. An overnight culture is obtained from single colonies, and plasmid DNA is

0171 4242516

0104

INVENT

0171 4242516

27/07 00 15:21

obtained from this. This DNA is characterized by means of restriction analysis and DNA sequence analysis. Correct plasmids which encode the modified A chain are called pIK100. Expression is carried out in analogy to Example 3 of the abovementioned German Patent Application P 38 21 159.9. The modified mono-Arg-insulin is likewise prepared in analogy to the preparation of the unmodified mono-Arg-insulin described in this German Patent Application.

10 Example 2

Construction of a plasmid for the preparation of Ser(A21)-human insulin (Arg B31-OH)

The construction corresponds to the route described in the above example. The synthetic DNA sequence is, however, modified as follows:

5' - CTG GAA AAC TAC TGT TCA TGA TAG  
GAC CTT TTG ATG ACA AGT ACT ATC AGCT - 5'

The plasmid pIK110 which has an additional BspHI recognition sequence is obtained.

20 Example 3

Construction of a plasmid for the preparation of Gly(A21)-Asn(B10)-human insulin-Arg(B31-OH)

DNA from the plasmid pIK100 is cleaved with the restriction enzymes HpaI and Dra3 and treated with alkaline bovine phosphatase. The two resulting fragments are separated by gel electrophoresis, and the larger of the two fragments is isolated. The fragment is ligated with the synthetic DNA sequence

5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC TTG

TTG GTT GTG AAC ACA CCA AGA TTG - 5'

and competent E. coli W3110 cells are transformed with the ligation mixture. Further characterization of the resulting plasmid pIK101 is carried out as described in Example 1.

#### Example 4

Construction of a plasmid for the preparation of Ser(A21)-Asn(B10)-human insulin

The construction corresponds to the cloning described in Example 3, but starting from DNA from the plasmid pIK110. The newly constructed plasmid is called pIK111.

#### Example 5

Construction of an expression plasmid for monkey proinsulin

Monkey proinsulin differs from human proinsulin merely by replacement of a single amino acid in the C peptide (B37-Pro in place of Leu in this position of human proinsulin).

The plasmid pSW3 is opened with Hpa1 and Sall and the remaining plasmid DNA is isolated. The Dra3-Sall monkey proinsulin fragment is isolated from the plasmid pK50 described in EP-A-0,229,998. The two fragments are linked to the synthetic DNA fragment

5' - AAC CAG CAC CTG TGC GGT TCT CAC CTA  
TTG GTC GTG GAC ACG CCA AGA GTG - 5'

in a T4 DNA ligase reaction. The plasmid pSW2 is obtained, and its DNA is used hereinafter as starting material for the constructions of the expression plasmids encoding the di-Arg-human insulin derivatives.

### Example 6

Construction of a plasmid for the preparation of Gly(A21)-human insulin Arg(B31)-Arg(B32)-OH

- 5 DNA of the plasmid pSW2 is cleaved with Pvu2 and Sal1 in accordance with Example 1 and ligated with the synthetic DNA from Example 1; the result is the plasmid pSW21.

### Example 7

Construction of a plasmid for the preparation of Ser(A21)-human insulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

- 10 The plasmid pSW22 is constructed starting from pSW2 DNA in analogy to Example 2.

### Example 8

Construction of a plasmid for the preparation of Gly(A21)-Asn(B10)-human insulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

- 15 The plasmid pSW23 is constructed starting from pSW21 DNA in analogy to Example 3.

The following sequence is used as synthetic DNA sequence for this:

- 5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC CTA  
20 TTG GTT GTG AAC ACA CAA AGA TTC - 5'

### Example 9

Construction of a plasmid for the preparation of Ser(A21)-Asn(B10)-human insulin-B31(Arg)-B32(Arg)-OH

- 25 The plasmid pSW24 is constructed starting from pSW22 DNA in analogy to Example 4 using the synthetic DNA sequence described in Example 8.



B) Preparation of Asp<sup>A21</sup>-human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH from human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH by hydrolysis

1 g of human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH is suspended in 100 ml of H<sub>2</sub>O. The pH is adjusted to 2.5 by addition of HCl, and the solution is left at 37°C. After one week about one half of the material has been converted into Asp<sup>A21</sup>-human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH. The product is separated from the starting material in a manner known per se on an anion exchanger, is precipitated from the eluate and is crystallized in a buffer which contains 10.5 g of citric acid, 1 g of phenol and 5 ml of a 1 % strength zinc chloride solution per liter with a protein concentration of 5 g/l at pH 6.0. The yield is 390 mg of Asp<sup>A21</sup>-human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>.

C) Preparation of an injection solution

The insulin derivative from B is dissolved at a concentration of 1.4 mg/ml in a sterile vehicle solution of the following composition (per ml):  
18 mg of glycerol, 10 mg of benzyl alcohol, 80 µg of Zn<sup>2+</sup>, pH 4.0.

D) Action profile of an Asp<sup>A21</sup>-human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH composition in dogs by comparison with human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH and basal H insulin Hoechst<sup>(R)</sup> = an NPH (neutral protamine Hagedorn) composition containing about 10 µg of Zn<sup>2+</sup>.

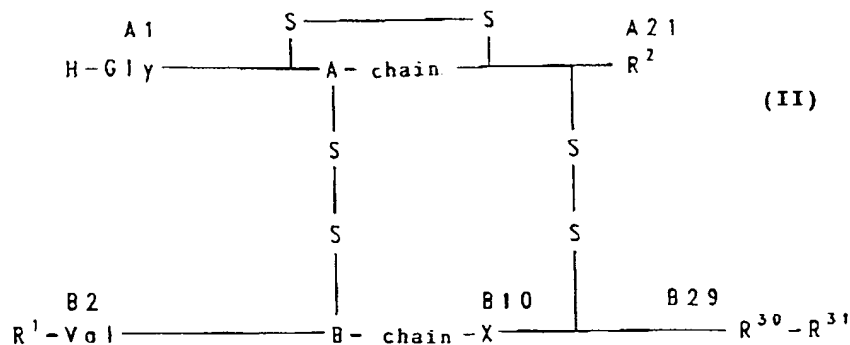
| Product                    | Blood glucose as a % of the initial level in hours (h) |     |     |     |    |    |
|----------------------------|--|-----|-----|-----|----|----|
|                            | 1 h  | 2 h | 3 h | 5 h | 7h |    |
| According to the invention | Asp <sup>A21</sup> -human insulin                      |     |     |     |    |    |
|                            | Arg <sup>B31</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH             | 99  | 62  | 51  | 75 | 98 |

|    |            |  |    |    |    |    |     |
|----|------------|--|----|----|----|----|-----|
| 5  | Comparison | Human insulin                              |    |    |    |    |     |
|    |            | Arg <sup>B21</sup> -Arg <sup>B32</sup> -OH | 77 | 52 | 64 | 85 | 98  |
| 10 |            | Basal H insulin                            |    |    |    |    |     |
|    |            | Hoechst <sup>(B)</sup>                     | 71 | 49 | 59 | 83 | 100 |

This example shows that Asp<sup>A21</sup>-human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH has the same advantageous basal profile as human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH. In addition, Asp<sup>A21</sup>-human insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH has the advantageous property that the compound is stable for a long time under the chosen conditions.

Patent claims for the Contracting States:  
AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. An insulin derivative of the formula II



- 5 in which
- $R^1$  denotes H or H-Phe,
- $R^2$  denotes a genetically encodable L-amino acid which contains no amide group,
- $R^{30}$  represents the residue of a neutral genetically encodable L-amino acid,
- 10  $R^{31}$  represents a physiologically acceptable organic radical from the group: amino- $(C_2-C_6)$ -alkoxy,  $(C_1-C_4)$ -alkylamino- $(C_2-C_6)$ -alkoxy, di- $(C_1-C_4)$ -alkylamino- $(C_2-C_6)$ -alkoxy, tri- $(C_1-C_4)$ -amono- $(C_2-C_6)$ -alkoxy,
- 15 amino- $(C_2-C_6)$ -alkylamino [( $C_1-C_4$ )-alkylamino]- $(C_2-C_6)$ -alkylamino, di- $(C_1-C_4)$ -alkylamino- $(C_2-C_6)$ -alkylamino or [tri- $(C_1-C_4)$ -alkylamino]- $(C_2-C_6)$ -alkylamino, in particular  $-O-[CH_2]_p-NR_2$ ,  $-O-[CH_2]_p-N^+R_3$ ,  $-NH[CH_2]_p-NR_2$  or  $-NH-[CH_2]_p-N^+R_3$ , in which
- 20  $p = 2$  to  $6$  and  $R$  is identical or different and is hydrogen or  $(C_1-C_4)$ -alkyl, or
- 25 represents 1 to 3  $\alpha$ -amino acids, whose terminal carboxyl functionality which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a

lactone or reduced to  $\text{CH}_2\text{OH}$ , and  
X represents a genetically encodable L-amino  
acid,

5 which has an isoelectric point between 5 and 8.5,  
and the physiologically tolerated salts thereof.

2. An insulin derivative and the physiologically  
tolerated salts thereof as claimed in claim 1,  
wherein  $\text{R}^1$  in formula II represents H-Phe.
- 10 3. An insulin derivative and the physiologically  
tolerated salts thereof as claimed in claim 1 or 2,  
wherein  $\text{R}^2$  in formula II represents Gly, Ala, Ser,  
Thr, Asp or Glu, in particular only Asp.
- 15 4. An insulin derivative and the physiologically  
tolerated salts thereof as claimed in one or more of  
claims 1 to 3, wherein  $\text{R}^{30}$  in formula II represents  
Ala, Thr or Ser.
- 20 5. An insulin derivative and the physiologically  
tolerated salts thereof as claimed in one or more of  
claims 1 to 4, wherein  $\text{R}^{31}$  in formula II represents  
Arg-OH or Arg-Arg-OH.
- 25 6. An insulin derivative and the physiologically  
tolerated salts thereof as claimed in one or more of  
claims 1 to 5, wherein X in formula II denotes Asn  
or Gln.
- 30 7. An insulin derivative and the physiologically  
tolerated salts thereof as claimed in one or more of  
claims 1 to 6, wherein the sequences (A1 to A20) and  
(B1 to B9, B11 to B29) in formula II are the  
sequences of human, porcine or bovine insulin, in  
particular the sequences of human insulin.
8. The use of the insulin derivatives and the physio-  
logically tolerated salts thereof as claimed in one

or more of claims 1 to 7 as active substances for pharmaceutical compositions for the treatment of diabetes mellitus.

- 5 9. A pharmaceutical composition which contains an effective amount of at least one insulin derivative of the formula II and/or at least one of the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 7 in dissolved, amorphous and/or crystalline - preferably in dissolved - form.
- 10 10. A pharmaceutical composition as claimed in claim 9, which additionally contains 1 µg to 2 mg, preferably 5 µg to 200 µg, of zinc/ml.
- 15 11. A pharmaceutical composition as claimed in claim 9 or 10, which additionally contains unmodified insulin, preferably unmodified human insulin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 368 187 B1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag der Patentschrift: **01.09.93**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C07K 15/00, A61K 37/02**

(21) Anmeldenummer: **89120462.0**

(22) Anmeldetag: **06.11.89**

Die Akte enthält technische Angaben, die nach dem Eingang der Anmeldung eingereicht wurden und die nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

(54) **Neue Insulinderivate, ihre Verwendung und eine sie enthaltende pharmazeutische Zubereitung.**

(30) Priorität: **08.11.88 DE 3837825**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**16.05.90 Patentblatt 90/20**

(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die  
Patenterteilung:  
**01.09.93 Patentblatt 93/35**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(56) Entgegenhaltungen:  
**EP-A- 0 046 979**  
**EP-A- 0 133 285**  
**EP-A- 0 254 516**

(73) Patentinhaber: **HOECHST AKTIENGESELL-  
SCHAFT**

**D-65926 Frankfurt(DE)**

(72) Erfinder: **Dörschug, Michael, Dr.**  
**Sonnenleite 20**  
**D-4630 Bochum(DE)**

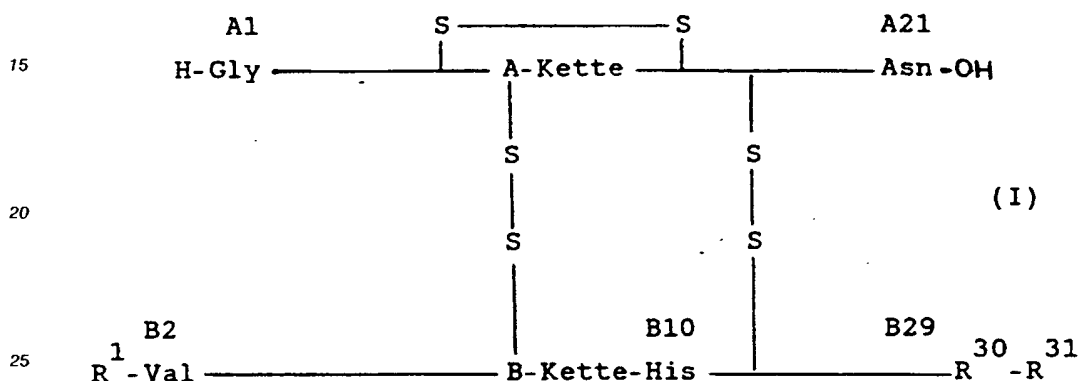
Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

**EP 0 368 187 B1**

## Beschreibung

Insulin und Insulinderivate werden bekanntlich in erheblichen Mengen zur Behandlung der Krankheit Diabetes mellitus benötigt und z.T. auch großtechnisch produziert. Trotz der beträchtlichen Zahl der bereits existierenden Insulin-Zubereitungen und -Abwandlungen mit unterschiedlichen Wirkungsprofilen besteht wegen der Verschiedenheit der Organismen mit deren inter- und intra-individuellen Schwankungen immer noch ein Bedarf an weiteren Insulinprodukten mit wieder anderen Eigenschaften und Wirkungscharakteristiken.

Insulinderivate mit einer verzögerten Wirkung sind z.B. beschrieben in EP-B-132 769 und EP-B-132 770. Es handelt sich um speziell in der Position B31 der Insulin-B-Kette basisch modifizierte Derivate der folgenden Formel I:



in welcher R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet,

R<sup>30</sup> für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und

R<sup>31</sup> für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxylfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann.

Für diese Insulinderivate ist ein isoelektrischer Punkt zwischen 5,8 und 8,5 (gemessen in der isoelektrischen Fokussierung) charakteristisch. Der - gegenüber dem isoelektrischen Punkt des unmodifizierten nativen Insulins oder Proinsulins (bei pH = 5,4) in den Neutralbereich hinein verschobene - isoelektrische Punkt ist durch die zusätzliche(n), an der Oberfläche des Moleküls befindliche(n) positive(n) Ladung(en) infolge der basischen Modifikation bedingt. Damit sind diese basisch modifizierten Insulinderivate im Neutralbereich weniger löslich als etwa natives Insulin oder Proinsulin, welche im Neutralbereich normalerweise gelöst vorliegen.

Die Verzögerungs- oder Depot-wirkung der basisch modifizierten Insulinderivate der Formel I geht auf deren Schwerlöslichkeit am isoelektrischen Punkt zurück. Die Wiederauflösung der Insulinderivate unter physiologischen Bedingungen soll nach den beiden vorerwähnten Druckschriften durch Abspaltung der zusätzlichen basischen Gruppen erreicht werden, was je nach Derivat durch tryptische oder Trypsin-ähnlich und/oder Carboxypeptidase B oder der Carboxypeptidase B-ähnliche und/oder Esterase-Aktivität zustande kommt. Die jeweils abgespaltenen Gruppen sind entweder rein physiologische Metaboliten oder aber leicht metabolisierbare, physiologisch unbedenkliche Substanzen.

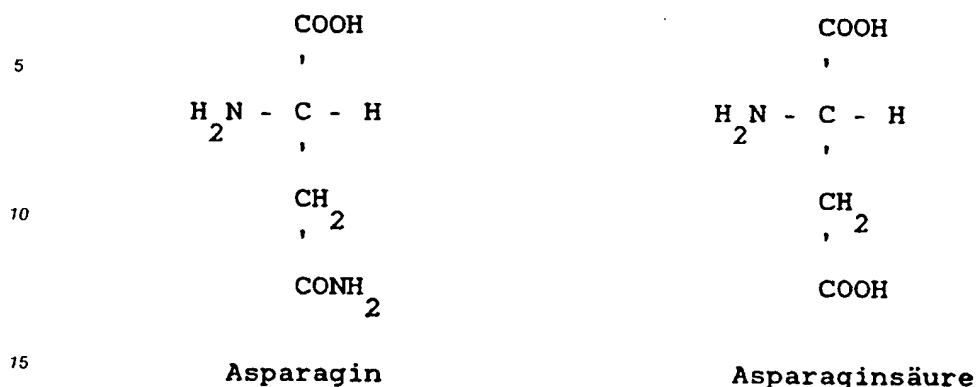
Das vorerwähnte Depotprinzip infolge basischer Modifikation des Insulins wurde noch weiter genutzt durch die Bereitstellung und entsprechende Verwendung anderer - hauptsächlich innerhalb der A- und B-Ketten - basisch modifizierter Insulinderivate; vgl. z.B. EP-A-0194 864 und EP-A-0254 516.

In den Insulinderivaten gemäß EP-A-0194 864 ist in B27-Position eine basische Aminosäure eingebaut und/oder eine neutrale Aminosäure sitzt in den Positionen A4, A17, B13 und/oder B21; außerdem ist die C-terminale Carboxylgruppe der B-Kette durch einen Amid- oder Esterrest blockiert.

Die Insulinderivate gemäß EP-A-0254 516 sind denen gemäß der vorher genannten EP-A sehr ähnlich; zwecks Stabilitätserhöhung bei den schwach sauren pH-Werten der entsprechenden pharmazeutischen Zubereitungen kann jedoch hier die Aminosäure Asn in Position A21 noch durch andere, in saurem Medium stabilere Aminosäuren wie z.B. Asp, ersetzt sein bzw. werden. Asn (= Asparagin) unterscheidet sich von Asp (= Asparaginsäure) bekanntlich durch die Blockierung einer der beiden Carboxylgruppen durch die



Amidgruppe:

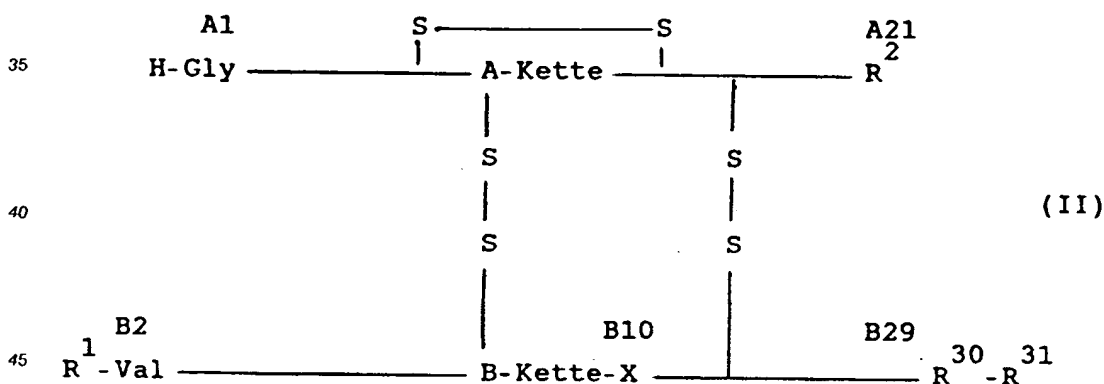


Durch eine wieder andere Modifikation des Insulinmoleküls in der A- und B-Kette, insbesondere durch Austausch des für die Komplexbildung mit Zink - und damit für eine gewisse Verzögerungswirkung verantwortliche - Aminosäure His in B10-Position durch anderen entsprechende Aminosäuren sollen schnell wirkende Insulinderivate resultieren; vgl. EP-A-0214 826.

Sämtliche Insulinderivate gemäß den 3 zuletzt genannten Druckschriften sind hauptsächlich innerhalb der A- und B-Ketten modifiziert; ihre Herstellung erfolgt auf gentechnologischem Wege.

In dem Bestreben, die Stabilität der am C-terminalen Ende der B-Kette basisch modifizierten Insulinderivate gemäß den eingangs erwähnten EP-Patentschriften EP-B-0132 769 und EP-B-0132 770 in saurem Medium zu erhöhen und gegebenenfalls auch deren Wirkungsprofil noch zu verändern, wurde nun gefunden, daß dieses Ziel in vorteilhafter Weise erreicht wird durch Ersatz von Asn<sup>21</sup> durch andere genetisch kodierbare Aminosäuren, welche keine Amidgruppe enthalten, und gegebenenfalls durch Substitution von His<sup>B10</sup> durch anderen genetisch kodierbare Aminosäuren.

Erfindungsgegenstand sind daher Insulinderivate der Formel II



in welcher

- 50  $\text{R}^1$  H oder H-Phe bedeutet,
  - $\text{R}^2$  eine genetisch kodierbare, keine Amidgruppe enthaltende L-Aminosäure bedeutet,
  - $\text{R}^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht,
  - $\text{R}^{31}$  für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxylfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu  $\text{CH}_2\text{OH}$  reduziert vorliegen kann, und
  - 55 X für eine genetisch kodierbare L-Aminosäure steht
- mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 8,5 und deren physiologisch verträglichen Salze.

Die neuen Insulinderivate und deren physiologisch verträgliche Salze sind bei den schwach sauren pH-Werten entsprechender pharmazeutischer Zubereitungen auch über längere Zeiträume stabil und besitzen - insbesondere wenn auch His<sup>B10</sup> noch durch andere Aminosäuren ausgetauscht ist - ein gegenüber den bekannten - unveränderten - basisch modifizierten Insulinderivaten der am Anfang angegebenen Formel I verändertes (kürzeres) Wirkungsprofil.

In Formel II ist R<sup>1</sup> vorzugsweise H-Phe.

Genetisch kodierbare, keine Amidgruppe enthaltende L-Aminosäuren - für R<sup>2</sup> - sind Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Glu, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro; bevorzugt sind Gly, Ala, Ser, Thr, Asp und Glu, insbesondere Asp.

Neutrale, genetisch kodierbare L-Aminosäuren - für R<sup>30</sup> - sind Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe und Pro; bevorzugt sind Ala, Thr und Ser.

R<sup>31</sup> ist eine physiologisch unbedenklich organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen, an deren Aufbau 0 - 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind. Wenn am Aufbau von R<sup>31</sup> keine  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind, kommen für diesen Rest z.B. folgende basischen Gruppen in Frage:

Amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkoxy, Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-ammonio-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkylamino, [(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkylamino, Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkylamino oder [Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-)-alkylamino, insbesondere -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> oder -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, worin p = 2 bis 6 ist und R gleich oder verschieden ist und für Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl steht.

Wenn am Aufbau von R<sup>31</sup> bis zu 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind, sind dies in erster Linie neutrale oder basische natürlich vorkommende L-Aminosäuren und/oder die diesen entsprechenden D-Aminosäuren. Neutral natürlich vorkommende Aminosäuren sind insbesondere Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro und Hyp. Basische natürlich vorkommende Aminosäuren sind insbesondere Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit und His. Falls nur neutrale  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind, kann deren endständige Carboxylfunktion - damit R<sup>31</sup> basischen Charakter hat - nicht frei sein; die Carboxylfunktion muß vielmehr in diesem Fall mit einer basischen Gruppe verestert oder amidiert sein, wobei als solche basischen Gruppen etwa die vorher - für den Fall, daß am Aufbau von R<sup>31</sup> keine  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind - erwähnten basischen Gruppen in Frage kommen. Natürlich können diese basischen Ester- oder Amidgruppen auch die Carboxylfunktion von basischen  $\alpha$ -Aminosäuren blockieren. Für die Blockierung der Carboxylfunktion der basischen  $\alpha$ -Aminosäuren können - falls die Blockierung gewünscht ist - auch neutrale Ester- oder Amidgruppen wie z.B. (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Cycloalkoxy, NH<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino in Frage kommen.

Als Lacton kann die endständige Carboxylfunktion natürlich nur vorliegen, wenn die endständige Aminosäure eine Hydroxyaminosäure ist.

Außerdem kann die endständige Carboxylfunktion auch zu CH<sub>2</sub>OH reduziert sein.

Bevorzugt besteht R<sup>31</sup> aus 1, 2 oder 3 der vorerwähnten basischen natürlich vorkommenden Aminosäuren; besonders bevorzugt ist R<sup>31</sup> = Arg-OH oder Arg-Arg-OH.

Als genetisch kodierbare L-Aminosäuren - für X - kommen die gleichen Aminosäuren wie für R<sup>2</sup> in Frage, wobei hier jedoch auch noch die genetisch kodierbaren L-Aminosäuren, welche eine Amidgruppen enthalten - d.s. Asn und Gln - möglich sind; letztere - Asn und Gln - sind hier sogar bevorzugt. Wenn Asn oder Gln sich in Position B10 befinden, ist die Amidgruppe jedenfalls in schwach saurem Medium stabil (im Gegensatz zu Asn oder Gln in Position A21.)

Die Sequenzen (A1 - A20) und (B1 - B9, B11 - B29) sind vorzugsweise die Sequenzen des Human-, Schweine- oder Rinder-Insulins, insbesondere die Sequenzen des Human-Insulins.

Beispielhafte Insulin-Derivate der Formel II sind:

|    |     |                        |          |
|----|-----|------------------------|----------|
|    | A21 | B31                    |          |
|    | Asp | -Humaninsulin-Arg      | -OH      |
|    | A21 |                        |          |
| 5  | Glu | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Gly | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Ser | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Thr | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
| 10 | Ala | -                      | "        |
|    | A21 | B31                    | B32      |
|    | Asp | -Humaninsulin-Arg      | -Arg -OH |
|    | A21 |                        |          |
| 15 | Glu | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Gly | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Ser | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Thr | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
| 20 | Ala | -                      | "        |
|    | A21 | B10                    | B31      |
|    | Asp | -Asn -Humaninsulin-Arg | -OH      |
|    | A21 |                        |          |
| 25 | Glu | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Gly | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Ser | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Thr | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
| 30 | Ala | -                      | "        |
|    | A21 | B10                    | B31      |
|    | Asp | -Asn -Humaninsulin-Arg | -Arg -OH |
|    | A21 |                        |          |
| 35 | Glu | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Gly | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Ser | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
|    | Thr | -                      | "        |
|    | A21 |                        |          |
| 40 | Ala | -                      | "        |

Die Herstellung der Insulin-Derivate der Formel II erfolgt hauptsächlich gentechnologisch mittels site-directed mutagenesis nach Standardmethoden.

45 Dazu wird eine für das gewünschte Insulin-Derivat der Formel II codierende Genstruktur konstruiert und in einer Wirtszelle - vorzugsweise in einem Bakterium wie E. coli oder einer Hefe, insbesondere Saccharomyces cerevisiae - zur Expression gebracht und - falls die Genstruktur für ein Fusionsprotein codiert - aus dem Fusionsprotein das Insulin-Derivat der Formel II freigesetzt; analoge Methoden sind z.B. beschrieben in EP-A-0 211 299, EP-A-0 227 938, EP-A-0 229 998, EP-A-0 286 956 und der DE-Patentanmeldung P 38 21  
50 159.9 vom 23.6.1988 (HOE 88/F 158).

Die Abspaltung des Fusionsproteinanteils erfolgt nach Zellaufschluß entweder chemisch mittels Halogencyan - vgl. EP-A-0 180 920 - oder enzymatisch mittels Lysostaphin - vgl. DE-A-37 39 347.

Der Insulinvorläufer wird dann der oxidativen Sulfitylyse nach der z.B. von R.C. Marshall und A.S. Inglis in "Practical Protein Chemistry - A Handbook" (Herausgeber A. Darbre) 1986, S. 49 - 53 beschriebenen  
55 Methode unterworfen und anschließend in Gegenwart eines Thiols unter Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken renaturiert, z.B. nach der von G.H. Dixon und A.G. Wardlow in Nature (1960), S. 721 - 724 beschriebenen Methode.

Das C-Peptid wird mittels tryptischer Spaltung entfernt - z.B. gemäß der Methode von Kemmler et al., J.B.C. (1971), S. 6786 - 6791

und das Insulinderivat der Formel II mittels bekannter Techniken wie Chromatographie - vgl. z.B. EP-A-0 305 760 - und Kristallisation gereinigt.

5 Die Herstellung der Insulin-Derivate der Formel II mit  $R^2 = \text{Asp}$  und  $X = \text{His}$  erfolgt zweckmäßig durch Hydrolyse der bekannten basisch modifizierten Insulin-Derivate der Formel I in wäßrig-saurem Medium (weil hier nur die Amidgruppe des Asparagins in Position A21 hydrolysiert werden muß), vorzugsweise bei pH-Werten zwischen etwa 2 und etwa 4, insbesondere von etwa 2,5, und bei Temperaturen von etwa 0 bis etwa 40 °C, vorzugsweise bei Raumtemperatur.

10 Die erfindungsgemäßen Insulin-Derivate der Formel II und/oder deren physiologisch verträgliche Salze (wie z.B. die Alkali- oder Ammoniumsalze) werden hauptsächlich als Wirkstoffe für eine pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung des Diabetes mellitus verwendet.

Die pharmazeutische Zubereitung ist vorzugsweise eine Lösung oder Suspension zu Injektionszwecken; sie ist gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem Insulin-Derivat der Formel II und/oder  
15 mindestens einem von deren physiologisch verträglichen Salzen in gelöster, amorpher und/oder kristalliner - vorzugsweise in gelöster - Form.

Die Zubereitung weist vorzugsweise einen pH-Wert zwischen etwa 2,5 und 8,5, insbesondere zwischen etwa 4,0 und 8,5, auf,

enthält ein geeignetes Isotoniemittel,

20 ein geeignetes Konservierungsmittel

und gegebenenfalls einen geeigneten Puffer,

sowie vorzugsweise auch eine bestimmte Zinkionen-Konzentration,

alles natürlich in steriler wäßriger Lösung. Die Gesamtheit der Zubereitungsbestandteile außer dem Wirkstoff bildet den Zubereitungs-Träger.

25 Geeignete Isotoniemittel sind z.B. Glycerin, Glukose, Mannit, NaCl, Calcium- oder Magnesium-Verbindungen wie  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  etc.

Durch die Wahl des Isotoniemittels und/oder Konservierungsstoffes beeinflusst man die Löslichkeit des Insulin-Derivats bzw. dessen physiologisch verträglichen Salzes bei den schwach sauren pH-Werten.

Geeignete Konservierungsmittel sind z.B. Phenol, m-Cresol, Benzylalkohol und/oder p-Hydroxybenzoesäureester.  
30

Als Puffersubstanzen, insbesondere zur Einstellung eines pH-Wertes zwischen etwa 4,0 und 8,5, können z.B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumphosphat etc. verwendet werden. Ansonsten sind zur Einstellung des pH-Wertes auch physiologisch unbedenkliche verdünnte Säuren (typischerweise HCl) bzw. Laugen (typischerweise NaOH) geeignet.

35 Wenn die Zubereitung einen Zinkgehalt besitzt, ist ein solcher von 1 µg bis 2 mg, insbesondere von 5 µg bis 200 µg Zink/ml bevorzugt.

Zwecks Variation des Wirkungsprofils der erfindungsgemäßen Zubereitung kann auch unmodifiziertes Insulin, vorzugsweise Rinder-, Schweine- oder Human-Insulin, insbesondere Human-Insulin, zugemischt werden.

40 Bevorzugte Wirkstoffkonzentrationen sind solche entsprechend etwa 1 - 1500, weiter bevorzugt etwa 5 - 1000 und insbesondere etwa 40 - 400 internationale Einheiten/ml.

Die Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

#### A) Gentechnologische Herstellung

45

##### **Beispiel 1**

Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Gly (A21)-Humaninsulin Arg (B31-OH)

50 In der DE-Patentanmeldung P 38 21 159.9 (HOE 88/F 158) wurde das Plasmid pSW3 beschrieben.

Die Plasmid-DNA wird mit den Restriktionsenzymen Pvu2 und Sal1 umgesetzt und anschließend mit alkalischer Rinderphosphatase behandelt. Die beiden entstehenden Fragmente werden gelelektrophoretisch getrennt und das große Fragment isoliert. Dieses Fragment wird in einer T4-DNA-Ligasereaktion mit folgender synthetischen DNA-Sequenz verknüpft:

55

5'- CTG GAA AAC TAC TGT GGT TGA TAG  
GAC CTT TTG ATG ACA CCA ACT ATC AGCT - 5'

5

Kompetente E.coli W3110 Zellen werden mit dem Ligationsansatz transformiert. Das Transformationsgemisch wird auf NA-Platten, die 20 µg Ap (= Ampicillin)/ml enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von einzelnen Kolonien wird eine Übernachtskultur gewonnen und aus dieser Plasmid-DNA gewonnen. Diese DNA wird mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzanalyse charakterisiert. Richtige Plasmide, die die veränderte A-Kette codieren, erhalten die Bezeichnung pIK100. Die Expression erfolgt analog Bsp. 3 der vorerwähnten DE-Patentanmeldung P 38 21 159.9. Die Herstellung des modifizierten Mono-Arg-Insulins erfolgt ebenfalls analog der in dieser DE-Patentanmeldung beschriebenen Herstellung des unmodifizierten Mono-Arg-Insulins.

#### 15 Beispiel 2

Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Ser(A21)-Humaninsulin (Arg B31-OH)

Die Konstruktion entspricht dem im obigen Beispiel beschriebenen Weg. Die synthetische DNA-Sequenz ist aber wie folgt abgewandelt:

25 5'- CTG GAA AAC TAC TGT TCA TGA TAG  
GAC CTT TTG ATG ACA AGT ACT ATC AGCT - 5'

Man erhält das Plasmid pIK110, das durch eine zusätzlich BspH1-Erkennungssequenz charakterisiert ist.

#### 30 Beispiel 3

Konstruktion eines Plasmids zur Herstellung von Gly(A21)-Asn(B10)-Humaninsulin-Arg(B31-OH)

35 DNA des Plasmides pIK100 wird mit den Restriktionsenzymen HpaI und Dra3 gespalten und mit alkalischer Rinderphosphatase behandelt. Die beiden entstehenden Fragmente werden gelelektrophoretisch getrennt und das größere der beiden Fragmente isoliert. Das Fragment wird mit der synthetischen DNA-Sequenz

40 5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC TTG  
TTG GTT GTG AAC ACA CCA AGA TTG - 5'

ligiert und kompetente E. coli W3110-Zellen mit dem Ligationsgemisch transformiert. Die weitere Charakterisierung des entstandenen Plasmides pIK101 erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

#### Beispiel 4

Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Ser(A21)-Asn(B10)-Humaninsulin

50

Die Konstruktion entspricht der in Beispiel 3 beschriebenen Klonierung, jedoch wird von DNA des Plasmides pIK110 ausgegangen.

Das neu konstruierte Plasmid erhält die Bezeichnung pIK111.

55

### Beispiel 5

Konstruktion eines Expressionsplasmides für Affenproinsulin

5 Affenproinsulin unterscheidet sich von humanem Proinsulin lediglich durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im C-Peptid (B37-Pro anstelle von Leu in dieser Position des humanen Proinsulins).

Das Plasmid pSW3 wird mit Hpa1 und Sal1 geöffnet und die Restplasmid-DNA isoliert. Aus dem in der EP-A-0 229 998 beschriebenen Plasmid pK50 wird das Dra3-Sal1-Affenproinsulinfragment isoliert. Die beiden Fragmente werden mit dem synthetischen DNA-Fragment

10

5' - AAC CAG CAC CTG TGC GGT TCT CAC CTA  
TTG GTC GTG GAC ACG CCA AGA GTG - 5'

15

in einer T4-DNA-Ligasereaktion verknüpft. Man erhält das Plasmid pSW2, dessen DNA im folgenden als Ausgangsmaterial für die Konstruktionen der die Di-Arg-Humaninsulinderivate kodierenden Expressionsplasmide dient.

### 20 Beispiel 6

Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Gly(A21)-Humaninsulin Arg(B31)-Arg(B32)-OH

DNA des Plasmides pSW2 wird entsprechend Beispiel 1 mit Pvu2 und Sal1 gespalten und mit der synthetischen DNA aus Beispiel 1 ligiert; es entsteht das Plasmid pSW21.

25

### Beispiel 7

Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Ser(A21)-Humaninsulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

30

Ausgehend von pSW2-DNA wird analog zu Beispiel 2 das Plasmid pSW22 konstruiert.

### Beispiel 8

35 Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Gly(A21)-Asn(B10)-Humaninsulin-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

Ausgehend von pSW21-DNA wird analog zu Beispiel 3 das Plasmid pSW23 konstruiert.  
Als synthetische DNA-Sequenz wird dabei folgende Sequenz verwendet:

40

5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC CTA  
TTG GTT GTG AAC ACA CAA AGA TTG - 5'

45

### Beispiel 9

Konstruktion eines Plasmides zur Herstellung von Ser(A21)-Asn(B10)-Humaninsulin-B31(Arg)-B32(Arg)-OH

50 Ausgehend von pSW22-DNA wird analog Beispiel 4 unter Verwendung der in Beispiel 8 beschriebenen synthetischen DNA-Sequenz das Plasmid pSW24 konstruiert.

**B) Herstellung von Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH aus Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH mittels Hydrolyse**

55

1 g Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH wird in 100 ml H<sub>2</sub>O aufgeschlämmt. Durch Zugabe von HCl wird der pH-Wert auf 2,5 eingestellt und die Lösung bei 37 °C belassen. Nach einer Woche ist ca. die Hälfte des Materials zu Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH umgesetzt. Das Produkt wird in an sich bekannter

Weise über einen Anionenaustauscher vom Ausgangsmaterial abgetrennt, aus dem Eluat gefällt und in einem Puffer, der pro Liter 10,5 g Citronensäure, 1 g Phenol und 5 ml einer 1 %igen Zinkchloridlösung enthält mit einer Proteinkonzentration von 5 g/l bei pH 6,0 kristallisiert. Die Ausbeute beträgt 390 mg Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>.

5

### C) Herstellung einer Injektionslösung

Das Insulin-Derivat gemäß B wird mit einer Konzentration von 1,4 mg/ml in einer sterilen Trägerlösung folgender Zusammensetzung (pro ml) gelöst:

10 18 mg Glycerin, 10 mg Benzylalkohol, 80 µg Zn<sup>2+</sup>, pH 4,0.

D) Wirkprofil einer Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH-Zubereitung am Hund im Vergleich zu Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH und Basal-H-Insulin Hoechst<sup>(R)</sup> = eine NPH-(Neutral-Protamin nach Hagedorn) Zubereitung mit ca. 10 µg Zn<sup>2+</sup>.

15

| Präparat             | Blutzucker in Prozent des Anfangswertes  |     |     |     |     |
|----------------------|--|-----|-----|-----|-----|
|                      | in Stunden (h)   |     |     |     |     |
|                      | 1 h  | 2 h | 3 h | 5 h | 7 h |
| erfindungs-<br>gemäß | <div> <div>Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin</div> <div>Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH</div> </div> |     |     |     |     |
|                      | 99   | 62  | 51  | 75  | 98  |
| Vergleich            | <div> <div>Humaninsulin</div> <div>Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH</div> </div>                   |     |     |     |     |
|                      | 77   | 52  | 64  | 85  | 98  |
|                      | <div> <div>Basal-H-Insulin</div> <div>Hoechst<sup>(R)</sup></div> </div>                                 |     |     |     |     |
|                      | 71   | 49  | 59  | 83  | 100 |

35

Dieses Beispiel zeigt, daß Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH das gleiche vorteilhafte Basalprofil zeigt wie Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH. Zusätzlich hat Asp<sup>A21</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH die vorteilhafte Eigenschaft, daß die Verbindung unter den gewählten Bedingungen langzeitstabil ist.

40

45

50

55

## Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

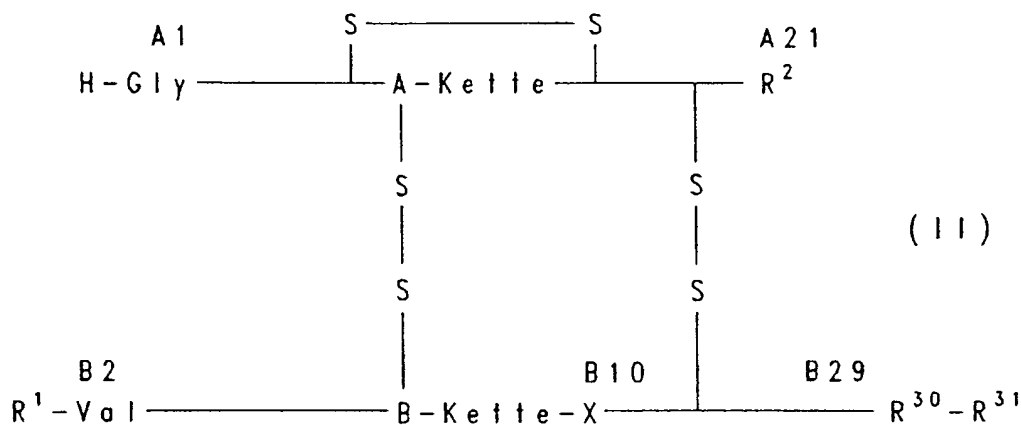
## 1. Insulin-Derivate der Formel II,

5

10

15

20



in welcher

R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet,R<sup>2</sup> eine genetisch kodierbare, keine Amidgruppe enthaltende L-Aminosäure bedeutet,R<sup>30</sup> für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht,

R<sup>31</sup> für einen physiologisch unbedenklichen organischen Rest aus der Gruppe: Amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-amono-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino [(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl-amino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino oder [Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, insbesondere -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -NH[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> oder -NH[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, worin p = 2 bis 6 ist und R gleich oder verschieden ist und für Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl steht oder

für 1 bis 3 α-Aminosäuren steht, deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann, und

X für eine genetisch kodierbare L-Aminosäure steht,

gekennzeichnet durch einen isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 8,5, und deren physiologisch verträglichen Salze.

2. Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel II R<sup>1</sup> für H-Phe steht.

3. Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel II R<sup>2</sup> für Gly, Ala, Ser, Thr, Asp oder Glu, insbesondere nur für Asp, steht.

4. Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel II R<sup>30</sup> für Ala, Thr oder Ser steht.

5. Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel II R<sup>31</sup> für Arg-OH oder Arg-Arg-OH steht.

6. Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel II X Asn oder Gln bedeutet.

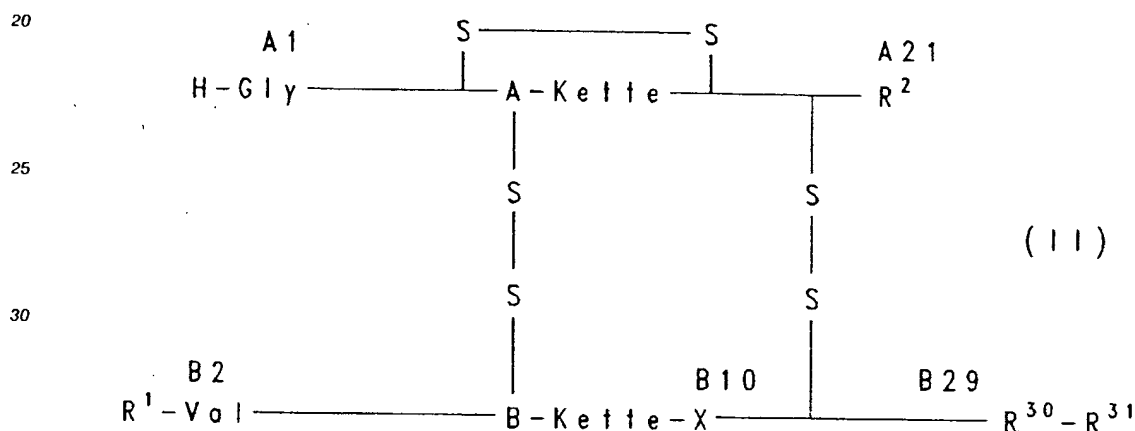
7. Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in Formel II die Sequenzen (A1 bis A20) und (B1 bis B9, B11 bis B29) die Sequenzen des Human-, Schweine- oder Rinderinsulins, insbesondere die Sequenzen des Humaninsulins sind.



8. Verwendung der Insulin-Derivate und deren physiologisch verträgliche Salze gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 als Wirkstoffe für pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung des Diabetes mellitus.
9. Pharmazeutische Zubereitung, gekennzeichnet durch eine wirksame Menge an mindestens einem Insulin-Derivat der Formel II und/oder mindestens einem von deren physiologisch verträglichen Salzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 in gelöster, amorpher und/oder kristalliner - vorzugsweise in gelöster - Form.
10. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 9, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt von 1 µg bis 2 mg, vorzugsweise 5 µg bis 200 µg Zink/ml.
11. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 9 oder 10, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt an unmodifiziertem Insulin, vorzugsweise unmodifiziertem Humaninsulin.

#### Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivate der Formel II,



in welcher

R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet,

R<sup>2</sup> eine genetisch kodierbare, keine Amidgruppe enthaltende L-Aminosäure bedeutet,

R<sup>30</sup> für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht,

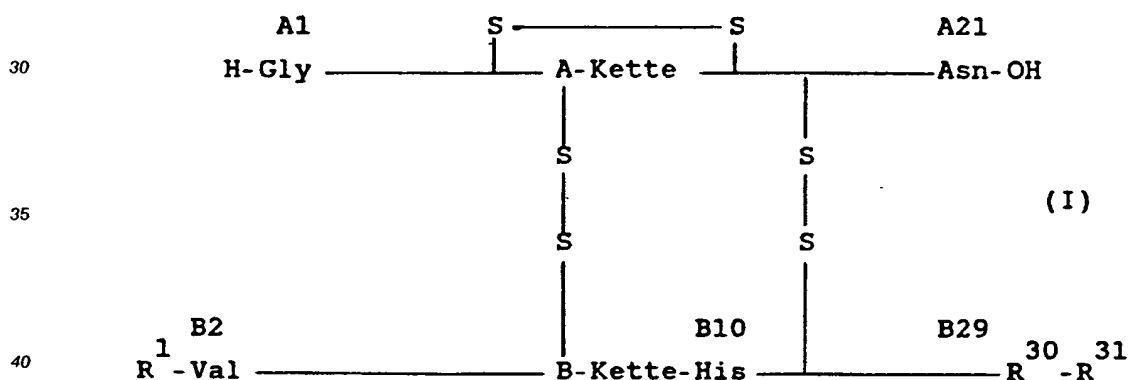
R<sup>31</sup> für einen physiologisch unbedenklichen organischen Rest aus der Gruppe: Amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-amono-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino [(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl-amino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino oder [Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, insbesondere -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>o</sup>R<sub>3</sub>, -NH[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> oder -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>o</sup>R<sub>3</sub>, worin p = 2 bis 6 ist und R gleich oder verschieden ist und für Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl steht oder

für 1 bis 3 α-Aminosäuren steht, deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxy-funktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann, und

X für eine genetisch kodierbare L-Aminosäure steht,

mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5 und 8,5, und der physiologisch verträglichen Salze dieser Insulin-Derivate, dadurch gekennzeichnet, daß man für diese Insulin-Derivate codierende Genstrukturen in einer Wirtszelle, vorzugsweise in einem Bakterium oder in einer Hefe, zur Expression bringt und - falls die Genstrukturen für ein Fusionsprotein codieren - aus dem erhaltenen Fusionsprotein das jeweilige Insulin-Derivat der Formel II freisetzt und gegebenenfalls in ein physiologisch verträgliches Salz überführt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel II, worin R<sup>1</sup> für H-Phe steht, herstellt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel II herstellt, worin R<sup>2</sup> für Gly, Ala, Ser, Thr, Asp oder Glu, insbesondere nur für Asp, steht.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel II herstellt, worin R<sup>30</sup> für Ala, Thr oder Ser steht.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel II herstellt, worin R<sup>31</sup> für Arg-OH oder Arg-Arg-OH steht.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel II herstellt, worin X Asn oder Gln bedeutet.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel II herstellt, worin die Sequenzen (A1 bis A20) und (B1 bis B9, B11 bis B29) die Sequenzen des Human-, Schweine- oder Rinderinsulins, insbesondere die Sequenzen des Humaninsulins sind.
8. Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten der Formel II gemäß der Definition in Anspruch 1, wobei jedoch
  - R<sup>2</sup> nur = Asp und
  - X = His ist,
 und der physiologisch verträglichen Salze dieser Insulin-Derivate, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin-Derivate der Formel I



worin R<sup>1</sup>, R<sup>30</sup> und R<sup>31</sup> die gleiche Bedeutung wie in Formel II (gemäß der Definition in Anspruch 1) besitzen, in wäßrig-saurem Medium der Hydrolyse unterwirft und die dabei entstehenden Insulin-Derivate der Formel II gegebenenfalls in deren physiologisch verträgliche Salze überführt.

9. Verwendung der Insulin-Derivate der Formel II gemäß der Definition in Anspruch 1 und der physiologisch verträglichen Salze dieser Insulin-Derivate als Wirkstoffe für pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung des Diabetes mellitus.
10. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wirksame Menge an mindestens einem Insulin-Derivat der Formel II und/oder mindestens einem von deren physiologisch verträglichen Salzen mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls mit weiteren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen in eine geeignete pharmazeutische Darreichungsform bringt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man der pharmazeutischen Zubereitung noch mindestens eine Zinkverbindung entsprechend einem Gehalt von 1 µg bis 2 mg, vorzugsweise 5

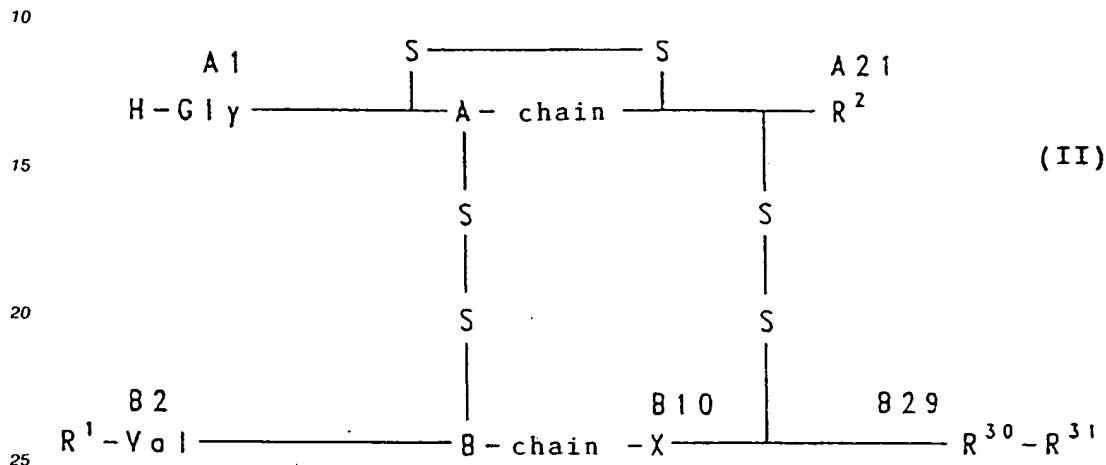
µg bis 200 µg Zink/ml, zusetzt.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß man der pharmazeutischen Zubereitung noch ein unmodifiziertes Insulin, vorzugsweise unmodifiziertes Humaninsulin, zusetzt.

## Claims

**Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE**

- 1. An insulin derivative of the formula II**



in which

- R<sup>1</sup>** denotes H or H-Phe  
**R<sup>2</sup>** denotes a genetically encodable L-amino acid which contains no amide group,  
**R<sup>30</sup>** represents the residue of a neutral genetically encodable L-amino acid,  
**R<sup>31</sup>** represents a physiologically acceptable organic radical from the group: amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylammonio-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, [(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino or [tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, in particular -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -NH[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> or -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, in which p = 2 to 6 and R is identical or different and is hydrogen or (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkyl, or represents 1 to 3 α-amino acids, whose terminal carboxyl functionality which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a lactone or reduced to CH<sub>2</sub>OH, and

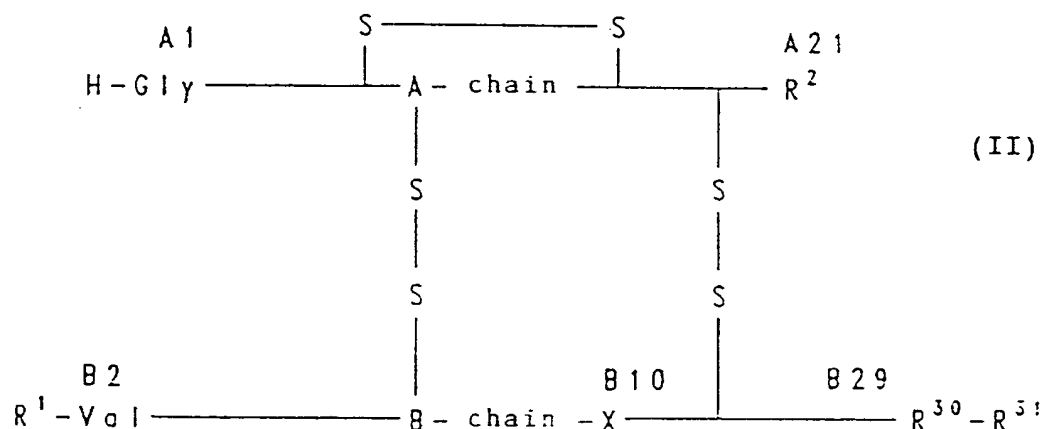
X represents a genetically encodable L-amino acid, which has an isoelectric point between 5 and 8.5, and the physiologically tolerated salts thereof.

2. An insulin derivative and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in claim 1, wherein R<sup>1</sup> in formula II represents H-Phe.
3. An insulin derivative and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in claim 1 or 2, wherein R<sup>2</sup> in formula II represents Gly, Ala, Ser, Thr, Asp or Glu, in particular only Asp.
4. An insulin derivative and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 3, wherein R<sup>30</sup> in formula II represents Ala, Thr or Ser.
5. An insulin derivative and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 4, wherein R<sup>31</sup> in formula II represents Arg-OH or Arg-Arg-OH.
6. An insulin derivative and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 5, wherein X in formula II denotes Asn or Gln.

7. An insulin derivative and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 6, wherein the sequence (A1 to A20) and (B1 to B9, B11 to B29) in formula II are the sequence of human, porcine or bovine insulin, in particular the sequence of human insulin.
8. The use of the insulin derivatives and the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 7, as active substance for pharmaceutical compositions for the treatment of diabetes mellitus.
9. A pharmaceutical composition which contains an effective amount of at least one insulin derivative of the formula II and/or at least one of the physiologically tolerated salts thereof as claimed in one or more of claims 1 to 7 in dissolved, amorphous and/or crystalline - preferably in dissolved - form.
10. A pharmaceutical composition as claimed in claim 9, which additionally contains 1  $\mu$ g to 2 mg, preferably 5  $\mu$ g to 200  $\mu$ g, of zinc/ml.
11. A pharmaceutical composition as claimed in claim 9 or 10, which additionally contains unmodified insulin, preferably unmodified human insulin.

#### Claims for the following Contracting States : ES, GR

1. A process for the preparation of an insulin derivative of the formula II



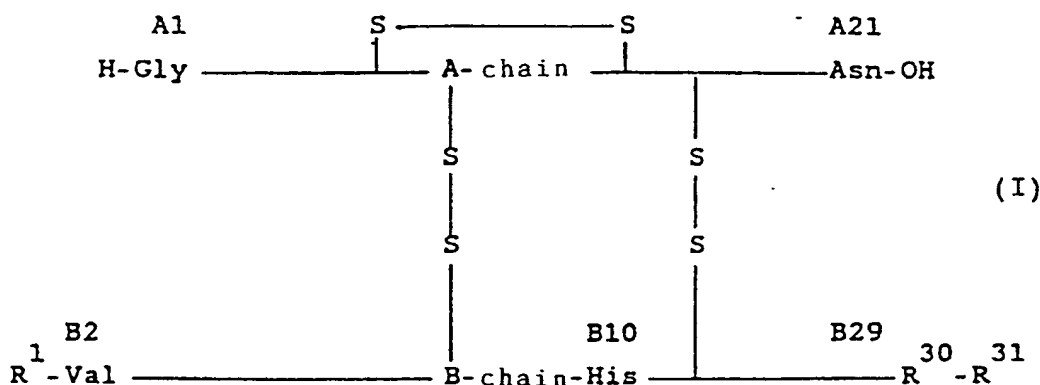
in which

- $\text{R}^1$  denotes H or H-Phe,  
 $\text{R}^2$  denotes a genetically encodable L-amino acid which contains no amide group,  
 $\text{R}^{30}$  represents the residue of a neutral genetically encodable L-amino acid,  
 $\text{R}^{31}$  represents a physiologically acceptable organic radical from the group: amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylammonio-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkoxy, amino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, [(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino or [tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-alkylamino, in particular -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, -O-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -NH[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> or -NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, in which p = 2 to 6 and R is identical or different and is hydrogen or (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkyl, or represents 1 to 3  $\alpha$ -amino acids, whose terminal carboxyl functionality which is present where appropriate can be free, in the form of an ester functionality, an amide functionality, a lactone or reduced to CH<sub>2</sub>OH, and

X represents a genetically encodable L-amino acid,

which has an isoelectric point between 5 and 8.5, and the physiologically tolerated salts thereof wherein the expression of a gene structure coding for this insulin derivative is brought about in a host cell, preferably in a bacterium or in a yeast, and - if the gene structure codes for a fusion protein - the respective insulin derivative is liberated from the fusion protein obtained and converted if required into a physiologically tolerated salt.

2. The process as claimed in claim 1, which comprises preparing an insulin derivative of the formula II in which R<sup>1</sup> represents H-Phe.
3. The process as claimed in claim 1 or 2, which comprises preparing an insulin derivative of the formula II in which R<sup>2</sup> represents Gly, Ala, Ser, Thr, Asp or Glu, in particular only Asp.
4. The process as claimed in one or more of claims 1 to 3, which comprises preparing an insulin derivative of the formula II in which R<sup>30</sup> represents Ala, Thr or Ser.
5. The process as claimed in one or more of claims 1 to 4, which comprises preparing an insulin derivative of the formula II in which R<sup>31</sup> represents Arg-OH or Arg-Arg-OH.
6. The process as claimed in one or more of claims 1 to 5, which comprises preparing an insulin derivative of the formula II in which X denotes Asn or Gln.
7. The process as claimed in one or more of claims 1 to 6, which comprises preparing an insulin derivative of the formula II in which the sequence (A1 to A20) and (B1 to B9, B11 to B29) are the sequence of human, porcine or bovine insulin, in particular the sequence of human insulin.
8. A process for the preparation of an insulin derivative of the formula II as defined in claim 1, but where  
R<sup>2</sup> is only Asp and  
X is His,  
and of the physiologically tolerated salts of this insulin derivative, which comprises subjecting an insulin derivative of the formula I



- in which R<sup>1</sup>, R<sup>30</sup> and R<sup>31</sup> have the same meaning as in formula II (as defined in claim 1), to hydrolysis in aqueous acidic medium, and converting the insulin derivative of the formula II produced thereby if required into the physiologically tolerated salts thereof.
9. The use of insulin derivatives of the formula II as defined in claim 1 and of the physiologically tolerated salts of these insulin derivatives as active substances for pharmaceutical compositions for the treatment of diabetes mellitus.
  10. A process for the preparation of a pharmaceutical composition, which comprises converting an effective amount of at least one insulin derivative of the formula II and/or at least one of its physiologically tolerated salts with a physiologically acceptable vehicle and, where appropriate, with further additives and/or auxiliaries into a suitable pharmaceutical presentation.
  11. The process as claimed in claim 10, wherein at least one zinc compound is also added, corresponding to a content of 1 µg to 2 mg, preferably 5 µg to 200 µg, of zinc/ml to the pharmaceutical composition.
  12. The process as claimed in claim 10 or 11, wherein an unmodified insulin, preferably unmodified human insulin, is also added to the pharmaceutical composition.

## Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

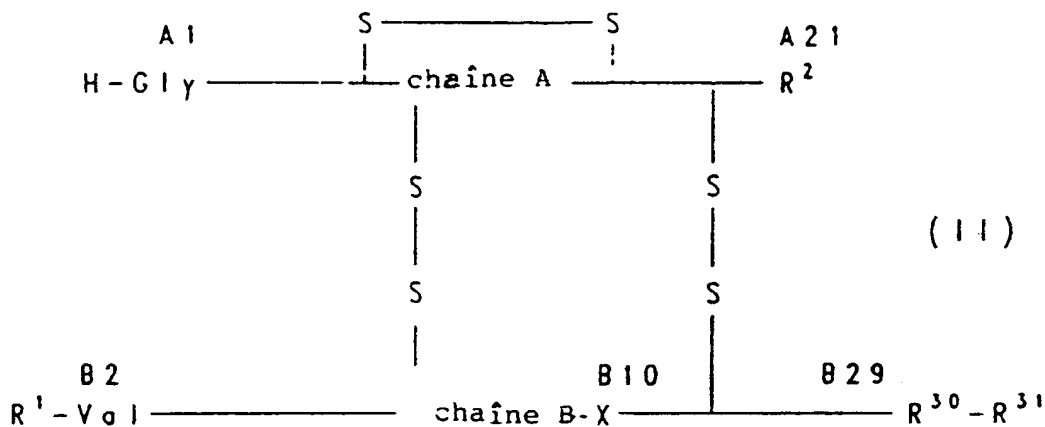
## 1. Dérivés d'insuline de formule II

5

10

15

20



dans laquelle

- R<sup>1</sup> représente H ou H-Phe,  
 R<sup>2</sup> représente un L-aminoacide génétiquement codable, ne contenant pas de groupe amido,  
 R<sup>30</sup> représente le reste d'un L-aminoacide neutre, génétiquement codable,  
 R<sup>31</sup> représente un groupe organique physiologiquement acceptable choisi parmi les groupes amino-alcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino-alcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), dialkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)aminoalcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), tri-alkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)ammonio-alcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), amino-alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino, [alkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino]alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino, dialkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino-alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino ou [trialkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino]alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino, en particulier -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> ou -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>, p allant de 2 à 6 et les radicaux R étant identiques ou différents et représentant un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ou de 1 à 3 α-aminoacides dont la fonction carboxyterminale éventuellement présente peut se trouver sous forme libre, sous forme de fonction ester, sous forme de fonction amide, sous forme de lactone ou réduite en CH<sub>2</sub>OH, et  
 X représente un L-aminoacide génétiquement codable, caractérisés par un point isoélectrique compris entre 5 et 8,5, et sels physiologiquement acceptables de ceux-ci.

2. Dérivés d'insuline et leurs sels physiologiquement acceptables selon la revendication 1, caractérisés en ce que, dans la formule II, R<sup>1</sup> représente H-Phe.

3. Dérivés d'insuline et leurs sels physiologiquement acceptables selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que, dans la formule II, R<sup>2</sup> représente Gly, Ala, Ser, Thr, Asp ou Glu, en particulier seulement Asp.

4. Dérivés d'insuline et leurs sels physiologiquement acceptables selon une ou plusieurs des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que, dans la formule II, R<sup>30</sup> représente Ala, Thr ou Ser.

5. Dérivés d'insuline et leurs sels physiologiquement acceptables selon une ou plusieurs des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que, dans la formule II, R<sup>31</sup> représente Arg-OH ou Arg-Arg-OH.

6. Dérivés d'insuline et leurs sels physiologiquement acceptables selon une ou plusieurs des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que, dans la formule II, X représente Asn ou Gln.

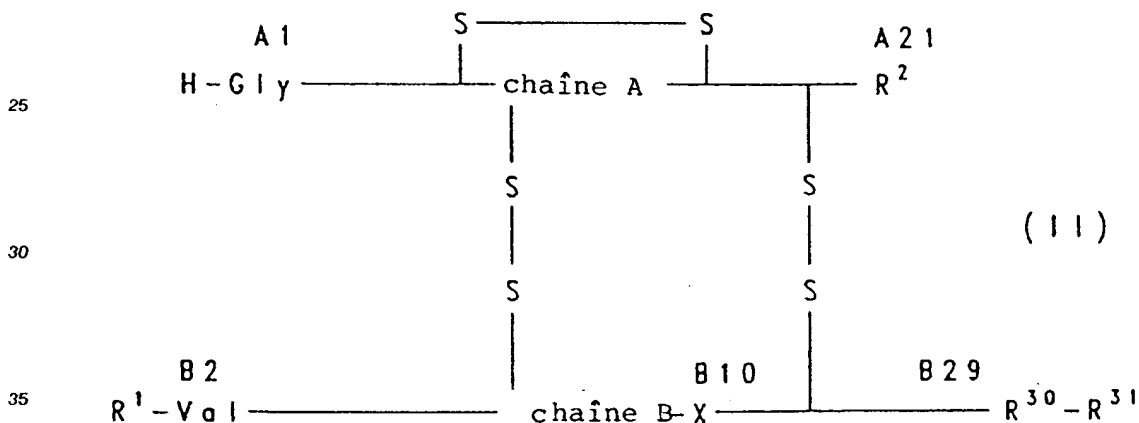
7. Dérivés d'insuline et leurs sels physiologiquement acceptables selon une ou plusieurs des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que, dans la formule II, les séquences (A1 à A20) et (B1 à B9, B11 à B29) sont les séquences de l'insuline humaine, porcine ou bovine, en particulier les séquences de

l'insuline humaine.

8. Utilisation des dérivés d'insuline et de leurs sels physiologiquement acceptables selon une ou plusieurs des revendications 1 à 7, en tant que substances actives pour des compositions pharmaceutiques pour le traitement du diabète sucré.
9. Composition pharmaceutique, caractérisée par une quantité efficace d'au moins un dérivé d'insuline de formule II et/ou d'au moins un de ses sels physiologiquement acceptables selon une ou plusieurs des revendications 1 à 7, sous forme dissoute, amorphe et/ou cristalline - de préférence sous forme dissoute.
10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée par une teneur supplémentaire en zinc allant de 1 µg à 2 mg, de préférence de 5 µg à 200 µg/ml.
11. Composition pharmaceutique selon la revendication 9 ou 10, caractérisée par une teneur supplémentaire en insuline non modifiée, de préférence en insuline humaine non modifiée.

#### Revendications pour les Etats contractants suivants : ES, GR

1. Procédé pour la préparation de dérivés d'insuline de formule II



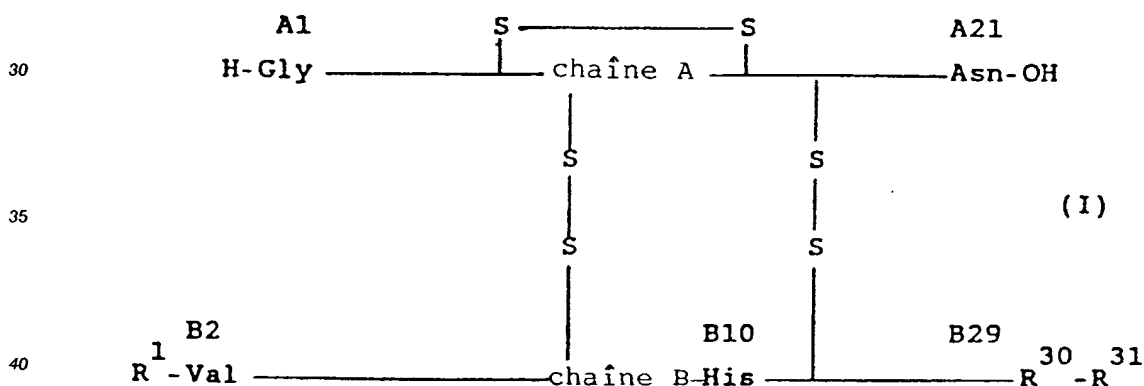
dans laquelle

- R<sup>1</sup> représente H ou H-Phe,
- R<sup>2</sup> représente un L-aminoacide génétiquement codable, ne contenant pas de groupe amido,
- R<sup>30</sup> représente le reste d'un L-aminoacide neutre, génétiquement codable,
- R<sup>31</sup> représente un groupe organique physiologiquement acceptable choisi parmi les groupes amino-alcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino-alcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), dialkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)aminoalcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), tri-alkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-ammonio-alcoxy(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), amino-alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino, [alkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino]alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino, dialkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino-alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino ou [trialkyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)amino]alkyl(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)amino, en particulier -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub>, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-N<sup>o</sup>R<sub>3</sub>, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NR<sub>2</sub> ou -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-N<sup>o</sup>R<sub>3</sub>, p allant de 2 à 6 et les radicaux R étant identiques ou différents et représentant un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ou de 1 à 3 α-aminoacides dont la fonction carboxyterminale éventuellement présente peut se trouver sous forme libre, sous forme de fonction ester, sous forme de fonction amide, sous forme de lactone ou réduite en CH<sub>2</sub>OH, et X représente un L-aminoacide génétiquement codable,

ayant un point isoélectrique compris entre 5 et 8,5, et des sels physiologiquement acceptables de ces dérivés d'insuline,

- caractérisé en ce que l'on exprime dans une cellule hôte, de préférence dans une bactérie ou dans une levure, des structures géniques codant pour ces dérivés d'insuline et - lorsque les structures géniques codent pour une protéine de fusion - on libère le dérivé d'insuline de formule II respectif à partir de la protéine de fusion obtenue, et éventuellement on le convertit en un sel physiologiquement acceptable.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on prépare des dérivés d'insuline de formule II dans lesquels R<sup>1</sup> représente H-Phe.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on prépare des dérivés d'insuline de formule II dans lesquels R<sup>2</sup> représente Gly, Ala, Ser, Thr, Asp ou Glu, en particulier seulement Asp.
4. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on prépare des dérivés d'insuline de formule II dans lesquels R<sup>30</sup> représente Ala, Thr ou Ser.
5. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on prépare des dérivés d'insuline de formule II dans lesquels R<sup>31</sup> représente Arg-OH ou Arg-Arg-OH.
6. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on prépare des dérivés d'insuline de formule II dans lesquels X représente Asn ou Gln.
7. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que l'on prépare des dérivés d'insuline de formule II dans lesquels les séquences (A1 à A20) et (B1 à B9, B11 à B29) sont les séquences de l'insuline humaine, porcine ou bovine, en particulier les séquences de l'insuline humaine.
8. Procédé pour la production de dérivés d'insuline de formule II selon la définition dans la revendication 1, mais dans lesquels
  - R<sup>2</sup> ne représente que Asp et
  - X = His,
 et des sels physiologiquement acceptables de ces dérivés d'insuline, caractérisé en ce que l'on soumet à l'hydrolyse en milieu aqueux-acide des dérivés d'insuline de formule I



dans laquelle R<sup>1</sup>, R<sup>30</sup> et R<sup>31</sup> ont les mêmes significations que dans la formule II (selon la définition donnée dans la revendication 1) et on convertit éventuellement en leurs sels physiologiquement acceptables les dérivés d'insuline de formule II ainsi obtenus.

9. Utilisation des dérivés d'insuline de formule II selon la définition dans la revendication 1 et des sels physiologiquement acceptables de ces dérivés d'insuline, en tant que substances actives pour des compositions pharmaceutiques pour le traitement du diabète sucré.
10. Procédé pour la préparation d'une composition pharmaceutique, caractérisé en ce que l'on met sous une forme pharmaceutique appropriée une quantité efficace d'au moins un dérivé d'insuline de formule II et/ou d'au moins l'un de ses sels physiologiquement acceptables, avec un véhicule physiologiquement acceptable, ainsi qu'éventuellement d'autres additifs et/ou adjuvants.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on ajoute à la composition pharmaceutique encore au moins un composé à base de zinc correspondant à une teneur en zinc de 1 µg à 2 mg, de préférence de 5 µg à 200 µg/ml.



**EP 0 368 187 B1**

12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que l'on ajoute encore à la composition pharmaceutique une insuline non modifiée, de préférence une insuline humaine non modifiée.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**